临床研究

锥型束CT评价茶多酚对放射性颌骨骨髓炎术后窦道愈合的疗效

罗敬中[1]，黄柏隆[2]，刘 奕[3]，徐秋荣[2]
龙门县人民医院[1]口腔科，[2]耳鼻喉科，广东 惠州 516800；[3]河源市人民医院口腔科，广东 河源 517000

摘要：目的 通过锥型束CT及窦道造影评价茶多酚对放射性颌骨骨髓炎术后窦道愈合的效果。**方法** 收集放射性颌骨骨髓炎术后伴有口腔黏膜窦道的患者30例，随机分2组，每组各15例。窦道分别每日予复方茶多酚含漱液（实验组）或生理盐水（对照组）局部冲洗及含漱，每3周使用锥型束CT行窦道造影成像，计算窦道体积变化。MTT法检测茶多酚对人永生化口腔黏膜上皮细胞系的增殖影响。**结果** 治疗12周后，实验组的窦道缩小情况优于对照组（5.40±4.15 cm^3 *vs* 8.12±5.47 cm^3），差异具有统计学意义（F=4.384，P=0.043）。CCK-8法检测发现，经120 mg/L茶多酚的处理后，人永生化口腔黏膜上皮细胞系的增殖速率高于无处理的对照组（0.162±0.030 *vs* 0.075±0.017），具有统计学意义（F=5.783，P=0.017）。**结论** 茶多酚可能通过促进口腔黏膜上皮增殖，加快放射性颌骨骨髓炎术后窦道的愈合。

关键词：茶多酚；放射性颌骨骨髓炎；窦道；上皮细胞；增殖

Effect of tea polyphenols on sinus healing in post-operative radioactive osteomyelitis of the jaws evaluated by cone beam CT

LUO JingZhong[1], HUANG BaiLong[2], LIU Yi[3], XU Qiurong[2]
[1]Department of Stomatolog; [2]Department of ENT, People's Hospital of Longmen County, Huizhou 516800, China; [3]Department of Stomatology, People's Hospital of Heyuan, Heyuan 517000, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of tea polyphenols on sinus healing in post-operative radioactive osteomyelitis of jaws (ORN) by cone beam CT and contrast fistulography. **Methods** Thirty ORN cases with post-operative oral mucosa sinus were divided into 2 groups randomly. In experimental group, sinus was rinsed and gargled with tea polyphenols solution in daily. In control group, sinus was treated with normal saline. Sinus radiography was taken by cone beam CT every 3 weeks with calculation of sinus volume in 2 groups. Effect of tea polyphenols on proliferation of human immortalized oral mucosal epithelial cell line was detected by MTT. **Results** The sinus volume in experimental group was smaller than that in control group after 12 weeks of treatment (P<0.05). With treatment of 120 mg/L tea polyphenols, growth rate of NOK in experimental group was higher than that of control group (P<0.05). **Conclusion** Tea polyphenols can accelerate the healing of post-operative sinus in ORN through stimulating the proliferation of epithelium cell.

Keyword: tea polyphenols; radioactive osteomyelitis of jaws; sinus; epithelium cells; proliferation

放射性颌骨骨髓炎，是头颈部恶性肿瘤放疗后常见的口腔并发症之一[1]。颌骨在放射治疗后，处于低氧、低血管结构、低细胞活性的“三低”状态，容易发生无菌性坏死，并继发细菌感染，形成颌骨骨髓炎[2]。研究发现，茶多酚对放射性疾病有一定的防护作用[3]，同时具有抗氧化、抗感染等药理作用[4-5]。茶多酚的主要成分是儿茶素（黄烷-3-醇衍生物）[6]，对部分体细胞有促增殖作用，何权敏等[7]发现茶多酚可促进牙周膜成纤维细胞的体外增殖，但目前尚无其对口腔黏膜上皮作用的相关研究。由此设想，茶多酚是否可以通过促进口腔黏膜上皮细胞的增殖，加快放射性颌骨骨髓炎术后黏膜窦道的愈合。

本研究分别以放射性颌骨骨髓炎术后窦道患者及人永生化口腔黏膜上皮细胞系（NOK）为对象，通过比较窦道的体积变化及NOK细胞的增殖能力，探讨茶多酚促进放射性颌骨骨髓炎术后窦道愈合的效果，为放射性颌骨骨髓炎的辅助治疗提供实验依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集2013年1月~2016年6月于惠州市龙门县医院收治的放射性颌骨骨髓炎患者30例，采用1∶1病例对照研究方法，通过随机分配隐匿的方法（按顺序编码、不透光、密封的信封）分为实验组和对照组。该研究得到医院伦理委员会批准，并经所有患者签署知情同意书的前提下进行。

1.1.1 纳入标准 （1）头颈部肿瘤放疗史；（2）根据临床及影像表现，诊断为放射性颌骨骨髓炎，诊断标准参考Harris[8]提出的“射线照射的颌骨失去活性，暴露于

收稿日期：2017-01-08
基金项目：惠州市科技计划（2016Y260）
作者简介：罗敬中，主治医师，E-mail：619367565@qq.com

原本覆盖于其上的皮肤或黏膜下方，持续超过3个月且没有愈合，局部无肿瘤形成”；(3)接受常规手术治疗(包括病灶刮除、颌骨切除等术式)后，切口延期愈合并形成开口于口腔的窦道，且无口内外相通的瘘管形成。

1.1.2 排除标准 (1)除外其他疾病造成的骨破坏，如肿瘤、双膦酸盐性颌骨坏死[9]等；(2)术后经影像检查正式残余骨髓炎病灶或死骨；(3)怀孕或哺乳期妇女；(4)严重心血管疾病、肝肾功能不全者。

1.1.3 剔除标准 (1)对本研究中使用的药物过敏或有严重不良反应而不适应此临床实验者；(2)不遵医嘱或治疗中因各种原因未完成疗程或治疗不全者；(3)治疗期间发生严重疾病，不能继续进行治疗者；(4)疗程未到1/2者，不计入统计结果。根据上述标准，共纳入30例病例，单盲随机分为实验组及对照组，每组15例。其中对照组15例患者中有1例治疗后9周于外院作进一步诊治，退出本研究；实验组15患者中有2例因个人原因中途中断治疗。上述3例治疗时间均超过计划的1/2，故计入统计结果。对两组患者的基本资料进行均衡性比较，年龄、性别、放疗剂量、发病部位、手术方式等项目的差异不具有统计学意义(表1)。提示实验组与对照组的病例在上述项目的分布相对一致，无明显组间差异。

1.2 治疗方法

实验组患者隔日门诊复诊，予茶多酚含漱液冲洗未愈合的窦道，并嘱每日含漱茶多酚含漱液2次，3 min/次。对照组使用生理盐水冲洗病灶及含漱。每3周对窦口体积进行测量。测量方法如下：向窦道注入泛影葡胺，至造影剂充满窦道，并予医用水凝胶敷料封闭窦口，于锥型束CT扫描成像。锥型束CT选用Pax-Uni3D(Vatech, Korea)，扫描条件为110 kV、2.0 mA，曝光时间为3.6 s，由同一位经验丰富的影像科医生严格按照生产厂家的使用说明进行拍摄。参考何锦泉等[10]的方法，成像后使用Ez3D plus软件包(Vatech, Korea)按最大密度投影算法三维重建窦道，DICOM数据导入Mimics 14.1软件包，使用三维体积计算功能计算窦道体积。

1.3 茶多酚对口腔黏膜上皮细胞的生长影响

1.3.1 人口腔黏膜上皮细胞培养 NOK细胞系购自上海众华生物科技有限公司，NOK细胞在37 ℃、5% CO_2环境下培养于10% FBS的RPMI 1640完全培养基。

1.3.2 主要试剂及仪器 茶多酚(纯度98%)购自江西绿康天然产物有限公司；CCK-8购自日本同仁化学公司；RPMI 1640培养基及胎牛血清购自美国Gibco；M200全自动酶标仪购自瑞士Tecan。

1.3.3 CCK-8法检测细胞相对生长率 取对数生长期的NOK细胞接种于96孔板，$4×10^4$/孔，培养至细胞铺满孔底后吸弃原培养液，实验组加入含茶多酚(120 mg/L)完全培养液，对照组加入不含茶多酚的完全培养液，每天取8孔加入CCK-8溶液10 μL，孵育4 h，测量450 nm处各孔吸光度(OD值)。绘制1~5 d的细胞生长曲线。

1.4 统计学分析

运用SPSS23.0软件包对实验数据进行统计分析，计量资料以均数±标准差表示，用Mann-Whitney非参数秩和检验比较两组病例基本资料的一致性，窦道体积的变化及NOK细胞生长曲线采用重复测量数据的方差分析。所有统计假设检验为双侧检验，以$P<0.05$为差异具有统计学意义。

表1 患者基本资料

分组	性别(*n*, %)		年龄(岁, $\bar{x}±s$)	放疗剂量(Gy, *n*, %)			发病部位(*n*, %)		术式(*n*)			初始窦道体积(cm³, $\bar{x}±s$)
	男	女		<60	60~75	>75	上颌骨	下颌骨	病灶刮治术	颌骨方块切除	颌骨节段性切除	
实验组	8(53.33)	7(46.67)	48.80±9.75	1(6.67)	11(73.33)	3(20.00)	3(20.00)	12(80.00)	3	8	4	13.88±4.89
对照组	10(66.67)	5(33.33)	44.20±10.75	2(13.33)	11(73.33)	2(13.33)	5(33.33)	10(66.67)	5	6	4	14.68±5.38
Z	-0.733		-1.286	-0.582			-0.417		-0.492			-0.436
P	0.539		0.202	0.567			0.539		0.653			0.683

2 结果

2.1 窦道体积变化

基于锥型束CT的窦道造影可以重建出轮廓边界清晰的图像，同时可精确计算窦道体积(图1)。经过局部冲洗换药及口腔护理后，实验组及对照组患者的窦道体积均具有不同程度的缩小，呈现下降趋势(图2)。治疗后12周，实验组窦道体积小于对照组($5.40±4.15\ cm^3$ *vs* $8.12±5.47\ cm^3$)，实验组的疗效显著，组间差异有统计学意义($F=4.063$, $P=0.033$)。

2.2 NOK细胞生长曲线

经茶多酚培养后的NOK细胞(实验组)与普通完全培养基条件下培养的NOK细胞(对照组)进行比较，培养5 d后，实验组的细胞吸光度高于对照组(0.162±0.030 *vs* 0.075±0.017)，即实验组细胞增殖速率较高(图3)。两组的差异具有统计学意义($F=5.783$, $P=0.017$)，提示茶多酚对NOK细胞有促生长作用。

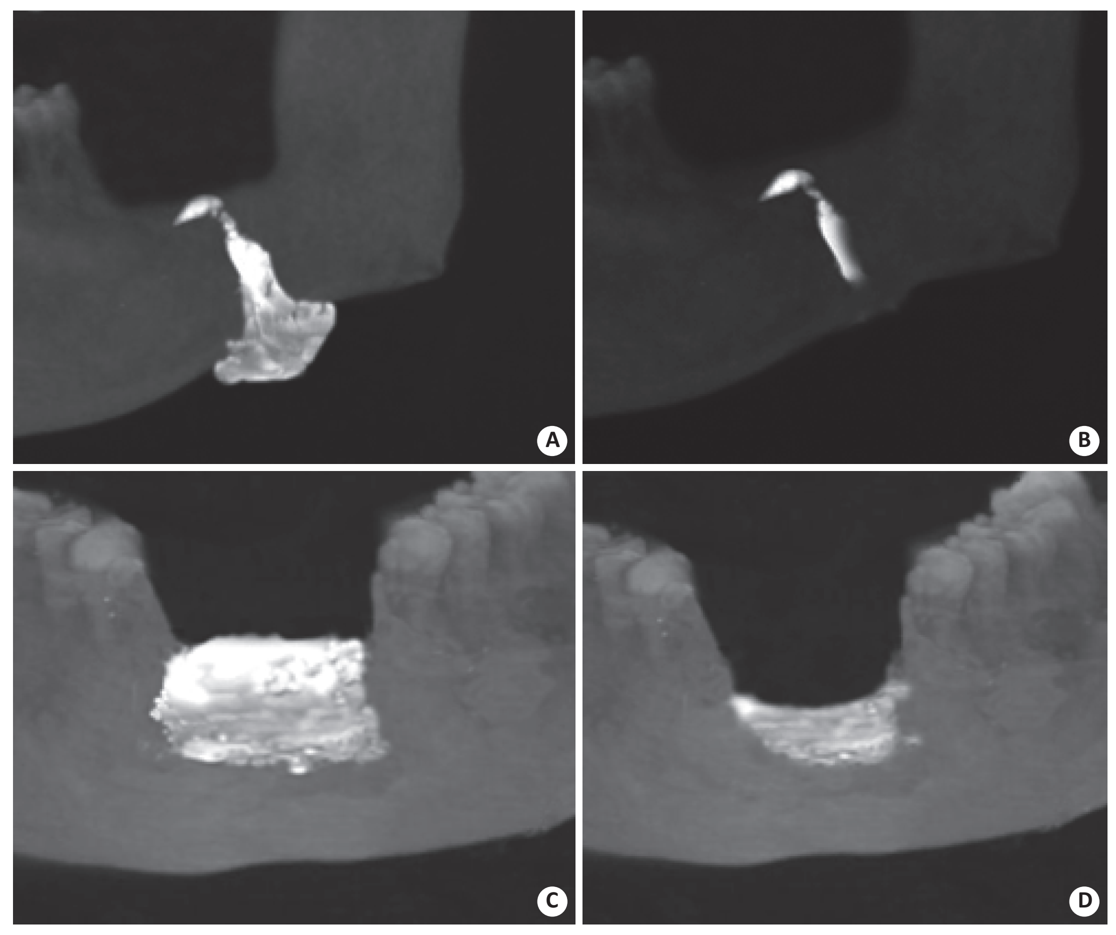


图1 窦道造影三维重建图像

A:实验组治疗前,左下颌骨方块切除术后,术区周边骨质未见明显破坏,提示病灶已清除。前庭沟出现窦口,窦口呈口小底大"烧瓶样"形态;*B*:实验组治疗12周后,患者接受茶多酚含漱液治疗后,窦道较前明显缩小;*C*:对照组治疗前,下颌骨前牙区方块切除术后,截骨区域形成一矩形窦道;*D*:对照组治疗12周后,窦道体积较前有所缩小,但体积仍较大.

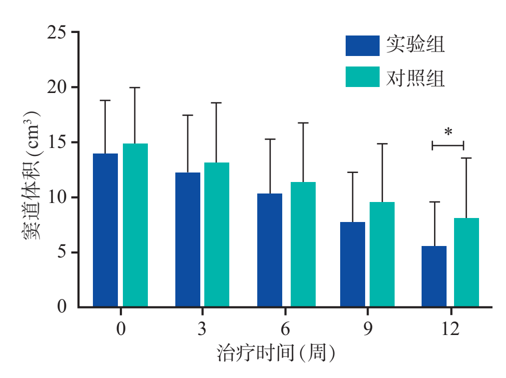


图2 窦道体积变化曲线

$^*P<0.05$.

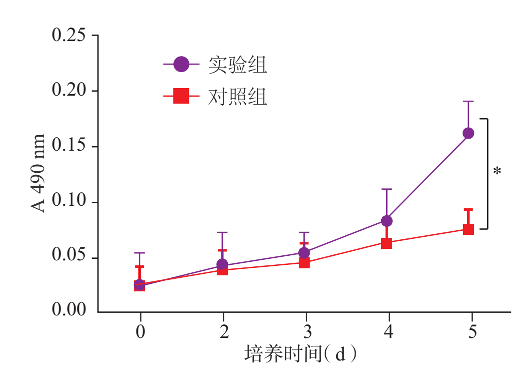


图3 NOK细胞生长曲线

$^*P<0.05$.

3 讨论

放射性颌骨骨髓炎主要通过外科手术彻底去除死骨,并去除病变的软组织,达到根治的目的[11]。但放射区域组织的纤维萎缩或纤维化,致使其增殖、抗感染及代谢能力低于正常组织,因而患者术后可能因出现创口愈合不良而继发形成窦道[12]。研究窦道的定位及体积测量,对于后续治疗有重要的参考意义。口腔颌面部的窦道定位及体积测量,可通过窦道造影,即向窦口注入造影剂(如碘胺醇、碘化油、泛影葡胺等)后进行X线成像而实现,常用于鳃裂囊肿、甲状舌管囊肿的术前检查[13-14]。本研究参考了上述方法,选用水溶性离子型单体碘造影剂泛影葡胺。与油性造影剂相比,水溶性的泛影葡胺流动性较强,造影后通过常规窦道冲洗即可去除。此外,有别于开口在皮肤且窦口狭小的窦道造影,纳入本研究的病例,窦口均开口于口腔内且窦口宽大,造影剂容易外溢,因此选用了贴合性及生物相容性良好的藻酸盐水凝胶敷料[15]封闭窦口。

窦道的治疗可分为手术治疗及保守治疗,伴有较大组织缺损的窦道一般采用转移组织瓣手术修

复[16]。而体积较小的瘘道则以局部冲洗换药为主，通过保持局部卫生，减少继发感染，促进上皮及肉芽生长覆盖，最终实现窦道的愈合。本研究发现使用茶多酚含漱液进行窦道冲洗换药，辅助治疗的效果理想，窦道的体积较对照组明显缩小，有利于加快创口愈合。希望通过细胞体外培养，初步了解茶多酚促进窦道愈合的作用机理。体外培养条件下，茶多酚对于上皮来源的细胞增殖作用不一。茶多酚对肿瘤细胞的诱导凋亡作用[17-18]，而对正常的上皮细胞则有促增殖作用。Hsu等[18]发现在体外培养条件下，茶多酚可促进角化上皮细胞的增殖及分化。本研究结果亦发现人永生化口腔黏膜的上皮细胞在120 mg/L的茶多酚诱导下，具有较强的增殖能力。提示茶多酚可能通过促进上皮细胞增殖，加快窦道愈合的速度。

此外，暴露于口腔的窦道常伴发细菌感染，也可能影响创口的愈合。放射性颌骨骨髓炎中常见的致病菌为金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌[19]。钱丽红等[20]验证了茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌作用。提示口腔局部使用茶多酚含漱液，可能对窦道中的金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌有抑制作用，减少继发感染，但这一猜想仍需要进一步的实验验证。

综上所述，本研究通过基于锥型束CT的窦道造影技术对放射性颌骨骨髓炎患者的术后窦道进行了定位及体积测量，并发现茶多酚可能通过促进口腔黏膜上皮细胞增殖，加快窦道愈合。

参考文献:

[1] 廖 伟, 王建广, 周年苟, 等. 口腔科医生全程干预对头颈部恶性肿瘤放疗并发症影响的临床研究[J]. 广东牙病防治, 2016, 24(4): 225-8.

[2] Marx RE. A new concept in the treatment of osteoradionecrosis[J]. J Oral Maxillofac Surg, 1983, 41(6): 351-7.

[3] 彭 哲, 徐志文, 温文胜, 等. 茶多酚对放射性下颌下腺的防护作用[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2010, 17(2): 99-105.

[4] Cong L, Cao C, Cheng Y, et al. Green tea polyphenols attenuated glutamate excitotoxicity via antioxidative and antiapoptotic pathway in the primary cultured cortical neurons[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 20(6): 205-11.

[5] Izdebska M, Klimaszewska WA, Hałas M, et al. Green tea extract induces protective autophagy in A549 non-small lung cancer cell line[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2015, 69(11): 1478-84.

[6] Zhuo X, Xie L, Shi FR, et al. The benefits of respective and combined use of green tea polyphenols and ERK inhibitor on the survival and neurologic outcomes in cardiac arrest rats induced by ventricular fibrillation[J]. Am J Emerg Med, 2016, 34(3): 570-5.

[7] 何权敏, 刘建国, 徐若竹. 茶多酚对人牙周膜成纤维细胞增殖的影响[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(8): 1409-11.

[8] Harris M. The conservative management of osteoradionecrosis of the mandible with ultrasound therapy[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 1992, 30(5): 313-8.

[9] 吴宇翎, 赵小朋, 严凌健, 等. 双膦酸盐类药物相关性颌骨坏死临床研究[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(1): 31-6.

[10] 何锦泉, 欧阳可雄, 王朝俭, 等. 锥形束CT在评估牙槽突裂骨缺损体积中的应用[J]. 口腔疾病防治, 2016, 24(5): 293-6.

[11] Shaw RJ, Dhanda J. Hyperbaric Oxygen in the management of late radiation injury to the head and neck. Part I: treatment[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2011, 49(1): 2-8.

[12] Delanian S, Depondt J, Lefaix JL. Major healing of refractory mandible osteoradionecrosis after treatment combining pentoxifylline and tocopherol: a phase II trial[J]. Head Neck, 2005, 27(2): 114-23.

[13] Sun Z, Fu K, Zhang Z, et al. Multidetector computerized tomographic fistulography in the evaluation of congenital branchial cleft fistulae and sinuses[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2012, 113(5): 688-94.

[14] Ranga U, Aiyappan SK, Veeraiyan S. Computed tomography fistulography demonstrating thyroglossal fistula: a case report[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2012, 114(3): e48-50.

[15] Ozaki CK, Hamdan AD, Barshes NR, et al. The prospective, randomized, multi-institutional clinical trial of a silver alginate dressing to reduce lower extremity vascular surgery wound complications[J]. J Vasc Surg, 2015, 61(2): 419-27.

[16] He YB, Liu Z, Tian ZC, et al. Retrospective analysis of osteoradionecrosis of the mandible: proposing a novel clinical classification and staging system[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2015, 44(12): 1547-57.

[17] Zhou Y, Tang J, Du Y, et al. The green tea polyphenol EGCG potentiates the antiproliferative activity of sunitinib in human cancer cells[J]. Tumour Biol, 2016, 37(7): 8555-66.

[18] Hsu S, Bollag WB, Lewis J, et al. Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 306(1): 29-34.

[19] Nguyen MT, Billington A, Habal MB. Osteoradionecrosis of the skull after radiation therapy for invasive carcinoma[J]. J Craniofac Surg, 2011, 22(5): 1677-81.

[20] 钱丽红, 陶 妍, 谢 晶. 茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌机理[J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1628-33.